

Efectividad de varias cepas comerciales de nematodos entomopatógenos sobre larvas de *Curculio elephas* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae)

A. JIMÉNEZ, C. A. ANTONIETTY, A. GALLARDO, F. J. SORIA, M. VILLAGRÁN, M. E. OCETE

Curculio elephas Gyllenhal (1836), es una importante plaga de los frutos de varias especies de frondosas, siendo especialmente dañino en castaños y encinares. En la encina (*Quercus ilex ballota* (Desfontaines) Sampaio) la actividad larvaria de este insecto carpófago provoca una caída prematura de los frutos y una disminución en el peso y tamaño de las bellotas, que conlleva pérdidas en la producción y, por tanto, en la montanera. También produce una disminución de la capacidad germinativa de las bellotas, ya que destruyen parte del embrión afectando de forma negativa a la regeneración natural de las dehesas y montes.

En este estudio se han ensayado varias cepas comerciales de nematodos entomopatógenos, (*Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, *H. megidis* Poinar, *Steinernema feltiae* (Filipjser) y *S. carpocapsae* (Weiser)) sobre larvas en último estadio para evaluar la susceptibilidad que presentan frente a cada una de ellas.

En los ensayos desarrollados en placas de Petri se observa que los mayores porcentajes de mortalidad los presentan *H. bacteriophora* con un 92%, mientras que el valor más bajo es el presentado por *H. megidis* (48%). En el caso de *H. bacteriophora*, a una dosis de 4.000 IJ/placa, se observa el mayor porcentaje de eficacia (87,5%) y con *S. feltiae*, a una dosis de 1.000 IJ/placa, un valor muy aproximado (86,66%). En el ensayo realizado en tierra, utilizando *H. bacteriophora* no se detectaron diferencias significativas entre las diferentes dosis a las dos semanas de su aplicación. En cuanto a la humedad idónea para realizar ensayos en tierra se obtuvo un valor del 15% (p/p).

En principio, estos datos nos indican que *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae* y *S. feltiae* pueden ser utilizados en programas de manejo integrado de *C. elephas* cuando se encuentra en su periodo de diapausa en el suelo, siendo especialmente recomendado *S. feltiae*.

A. JIMÉNEZ, C. A. ANTONIETTY, A. GALLARDO, F. J. SORIA, M. VILLAGRÁN, M. E. OCETE. Laboratorio de Entomología Aplicada. Dpto. Fisiología y Zoología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla. e-mail: pino@us.es

Palabras clave: *Quercus ilex*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis*, *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*.

INTRODUCCIÓN

C. elephas conocido vulgarmente como “balanino” de las castañas, es un fitófago que afecta a un gran número de frondosas aunque, en la región mediterránea, sus daños son más importantes en encinas y castaños. Diversos autores han citado la inci-

dencia y valorado los daños de esta plaga en diferentes partes de Europa y de la zona mediterránea como Argelia, Italia Polonia, Portugal y España (POMORSKI y TARNAWSKI, 1980; VÁZQUEZ *et al.*, 1990; MENU y DEBOUZIE, 1993; SORIA *et al.*, 1996; PAPARATI y SPERANZA, 1999; BRANCO *et al.*, 2002; CHAKALI *et al.*, 2002; LEIVA y FERNÁNDEZ-

ALÉS, 2005). En la encina (*Quercus ilex ballota* (Desfontaines) Sampaio) la actividad larvaria de este insecto carpófago provoca una caída prematura de los frutos (SORIA *et al.*, 2005), una disminución en el peso y tamaño de las bellotas lo que conlleva pérdidas en la producción y, por tanto, en la montanera (VÁZQUEZ *et al.*, 1990; SORIA *et al.*, 1999 a y b; BRANCO *et al.*, 2002). Al destruir parte del embrión del fruto se produce una disminución de la capacidad germinativa (SORIA *et al.*, 1996 y 1999 b), implicando una disminución de la autoregeneración de la arboleda en las dehesas y montes (LEIVA y FERNÁNDEZ-ALÉS, 2005).

C. elephas presenta un ciclo con una generación al año y cuatro estadios larvales. En los encinares del sur de España, los adultos emergen desde finales de septiembre o principios de octubre, coincidiendo con las primeras lluvias otoñales, y dejan de observarse a finales de octubre. Las puestas se observan desde mediados de septiembre o principios de octubre hasta finales de noviembre o mediados de diciembre. El desarrollo larvario dura entre 35 y 40 días, tras los cuales el fruto ha quedado totalmente excavado y lleno de excrementos (JIMÉNEZ *et al.*, 2005). Al finalizar su fase de alimentación en el fruto, salen y se entierran en el suelo donde construyen un cocón terroso para hibernar (MENU y DESOUHANT, 2002).

Actualmente, la legislación está tendiendo a la retirada de muchas materias activas usadas hasta ahora para el control de plagas que afectan a las masas forestales. Por ello, es necesario el estudio de nuevos productos que estén en consonancia con los nuevos objetivos de conseguir mantener sus poblaciones en niveles no dañinos mediante la utilización de programas de control integrado. Algunos de estos productos están basados en nematodos entomopatógenos pertenecientes a los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*. Ambos son parásitos obligados que buscan activamente en el sustrato a sus presas, que se mueven principalmente hacia abajo y a lo largo de toda la columna de suelo (FERGUSON *et al.*, 1995; GARCÍA,

2005). Tras la aplicación, los nematodos penetran por los orificios naturales del cuerpo de la larva o directamente a través de su pared. Una vez dentro, en cooperación con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* que liberan, son capaces de producir la muerte de larvas en 24-48 horas (FORST y CLARKE, 2002; DOLINSKI *et al.*, 2006). Existen diversos estudios que han demostrado la efectividad de estos nematodos para el control de otiórrincos (KAKOULI-DUARTE *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1999; PICOAGA *et al.*, 2008), curculionidos (KPE-NEKCI *et al.*, 2004; MORTON y GARCÍA DEL PINO, 2005) y algunos lepidópteros y dípteros (REYES, 2003).

Teniendo en cuenta las características, antes mencionadas, de estos nematodos entomopatógenos, pensamos que pueden parasitar y destruir las larvas de *C. elephas* que se encuentran en diapausa en el suelo de las dehesas. En este trabajo han sido ensayadas varias cepas comerciales, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, *H. megidis* Poinar, *Steinernema feltiae* (Filipjser) y *S. carpocapsae* (Weiser) para el control de larvas de *C. elephas*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las bellotas de las que se extrajeron las larvas de *Curculio elephas* fueron recolectadas a finales de noviembre de 2009 en una dehesa de encinas localizada en Sierra Morena, concretamente en la Sierra Norte de Sevilla, en la localidad de Almadén de la Plata. Las larvas de cuarto estadio de *C. elephas* tras salir de los frutos eran recogidas y colocadas en recipientes con arena esterilizada y colocadas dentro de cámaras acondicionadas a 22 °C y en oscuridad, hasta el momento de realizar los ensayos en el laboratorio.

En los ensayos se utilizaron cuatro especies de nematodos comercializados por la empresa Biobest S.L. Las especies utilizadas fueron *Heterorhabditis bacteriophora* (B-Green®), *H. megidis* (Heterorhabditis

System®), *Steinernema feltiae* (Steinernema System®), y *S. carpocapsae* (Carpocapsae System®).

Para estudiar la efectividad de los juveniles infectivos de las cuatro especies en el control de larvas de *C. elephas* se diseñó un ensayo de laboratorio en completa oscuridad, a temperatura constante de 22 ± 1 °C y con un $75 \pm 5\%$ de humedad relativa, condiciones idóneas para el desarrollo de los nematodos. Las unidades experimentales consistieron en cajas de Petri de 50 x 10 mm, con papel de filtro en el fondo. Se aplicaron 5 dosis de cada una de las cepas de juveniles. En cada placa se colocaron 5 larvas del coleóptero y se hicieron 5 repeticiones, para cada dosis. Las placas se rotularon y sellaron con parafina para evitar la desecación. Cada ensayo se repitió 2 veces. Se tomaron datos del número de individuos muertos cada 24 horas hasta las 96 horas. Las larvas se diseccionaron para comprobar la presencia de juveniles en su interior. Las dosis recomendadas por la empresa para la aplicación en suelo con uso curativo son: 1 millón de juveniles/m² para todos los productos, excepto para B-Green® que es de 0,5 millones/m². La superficie sobre la que se realizaron los ensayos era de 0,002 m², y las dosis usadas en las cajas de petri fueron: 250-5000-1.000-2.000-4.000 juveniles infectivos por placa. En los controles se añadió sólo agua destilada.

También se ensayó, en laboratorio, el producto B-Green® sobre larvas enterradas en recipientes de 80 mm de diámetro y 130 mm de alto con tierra. Los recipientes se llenaron con 300 g de tierra previamente esterilizada en autoclave a 121 °C durante 2 h. Las dosis probadas fueron: 1.250-2.500-5.000-10.000-20.000 juveniles infectivos por bote. En cada recipiente se colocaron 10 larvas de *C. elephas* y se hicieron 5 repeticiones, para cada dosis. Los recipientes se rotularon y cerraron durante el ensayo para que se mantuviera el nivel de humedad.

Previamente a la realización de estos ensayos se evaluó el nivel óptimo de humedad

para conocer cuando se produce la mayor infestación con B-Green®, en los mismos recipientes antes descritos. Los valores de humedad probados fueron: 5, 10, 15 y 20% (p/p), que se consiguieron añadiendo agua destilada. En cada recipiente se colocaron 10 individuos y se hicieron 5 repeticiones, para cada valor de humedad. Los botes se rotularon y cerraron durante el ensayo para evitar la pérdida de humedad. En cada recipiente se vertió 1 ml de agua con 5.000 juveniles infectivos, aplicado uniformemente sobre la superficie de la tierra, usando una pipeta. Diez minutos después, las larvas de *Curculio elephas* en cuarto estadio fueron colocadas sobre la superficie de la tierra para que se enterraran. El ensayo contó con un control donde se vertió sólo agua.

Los análisis de los datos de mortalidad fueron realizados con el SPSS v. 17.0. El nivel de significación utilizado en los análisis fue $P < 0,05$. Para obtener las eficacias de los tratamientos se han aplicado a los datos la formula de Abbot.

RESULTADOS

Los porcentajes de mortalidad obtenidos de los ensayos en placas de petri realizados sobre *Curculio elephas*, con las diferentes cepas comercializadas de nematodos entomopatógenos se muestran en el Cuadro 1. Las cuatro cepas de juveniles infestivos son capaces de localizar e infestar las larvas de *C. elephas*, sin embargo *H. megidis* presenta valores mucho más bajos que el resto. Los mayores porcentajes de mortalidad y de eficacia los presentan *H. bacteriophora* y *S. feltiae* (Cuadro 1). Por otro lado, los valores de mortalidad fueron similares entre las diferentes dosis utilizadas de cada una de las cepas comerciales.

Si analizamos las medias de los valores obtenidos a partir de la dosis recomendadas para la mayoría de las especies (2.000 IJ) se obtiene un valor de $P = 0,0003$ (Estadístico = 18,7473), que determina que hay diferencias estadísticamente significativas entre

Cuadro 1. Porcentajes de mortalidad de larvas de *Curculio elephas*, 96 horas después de la aplicación de varias especies de nematodos

Dosis	Control	<i>H. megidis</i>		<i>H. bactriophora</i>		<i>S. carpocapsa</i>		<i>S. feltiae</i>	
	% Mort	% Mort	% Efic	% Mort	% Efic	% Mort	% Efic	% Mort	% Efic
250 IJ	42	62	34,48	82	68,96	76	58,62	84	72,41
500 IJ	38	60	35,48	76	61,29	86	77,42	84	74,19
1.000 IJ	30	48	25,71	82	70	86	80	92	86,66
2.000 IJ	42	60	31,03	88	79,31	88	79,3	88	79,31
4.000 IJ	36	70	53,12	92	87,5	80	68,75	84	75

% Mort = % mortalidad; % Efic = % Eficacia (Abbot)

los nematodos utilizados. Al realizar el estudio del contraste múltiple de Rangos de Bonferroni se encontró que el grupo de *H. megidis* es el que muestra la diferencia con los otros tres como se puede apreciar en la Figura 1, siendo el valor de mortalidad de un 60% frente a un 87-88%.

Por otro lado, en la Figura 1 se observan diferencias en los porcentajes de mortalidad en el tiempo dependiendo de las especies. *S. feltiae* es el nematodo que actúa con

mayor rapidez, mostrando un valor cercano al 60% ya en las primeras 24 horas, mientras que el resto está por debajo del 35%.

En el Cuadro 2 se muestran los porcentajes de mortalidad obtenidos en tierra al aplicar el producto B-Green® sobre larvas enteradas después de 7 y 14 días del inicio del ensayo. Se observa que los valores de mortalidad, según la dosis, a la semana de la aplicación no presentan diferencias significativas ($\chi^2=7,289$; $p=0,121$) aunque la dosis

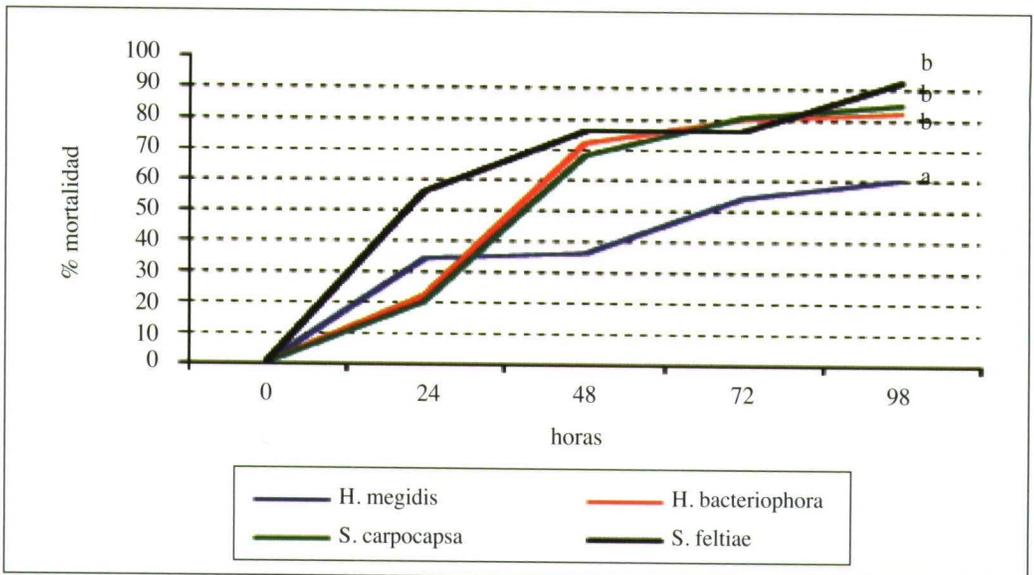


Figura 1. Porcentajes de mortalidad de larvas de *C. elephas* tratadas con cuatro especies de nematodos (dosis = 2.000 IJ por placa de Petri). Letras distintas indican diferencias significativas (Bonferroni $P<0,05$)

Cuadro 2. Porcentajes de mortalidad de larvas de *Curculio elephas* en suelo a los 7 y 14 días del inicio del ensayo con *Heterorhabditis bacteriophora*

Dosis	% mortalidad a 7 días	% mortalidad a 14 días
0	20	40
1.250 IJ	48	80
2.500 IJ	40	76
5.000 IJ	36	80
10.000 IJ	62	86
20.000 IJ	30	84

de 10.000 IJ presenta un valor sustancialmente más elevado que las otras cuatro dosis. A las dos semanas los porcentajes obtenidos de las diferentes dosis se igualan, no detectándose diferencias significativas entre ellos ($\chi^2=2,261$; $p=0,688$).

Los resultados del estudio del efecto de la humedad del suelo en la mortalidad de larvas de *C. elephas* utilizando *H. bacteriophora* se muestran en la Figura 2. Se observa que con un 20% de humedad se produce el 100% de mortalidad tanto en los recipientes

tratados como en los controles, lo que indica que la mortalidad se ha producido por el alto contenido en agua de los recipientes. En el caso del 15% de humedad los recipientes control presentan un 20% de mortalidad y en los ensayos con nematodos alcanzó un 94%.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en laboratorio sugieren que las cuatro cepas de nematodos

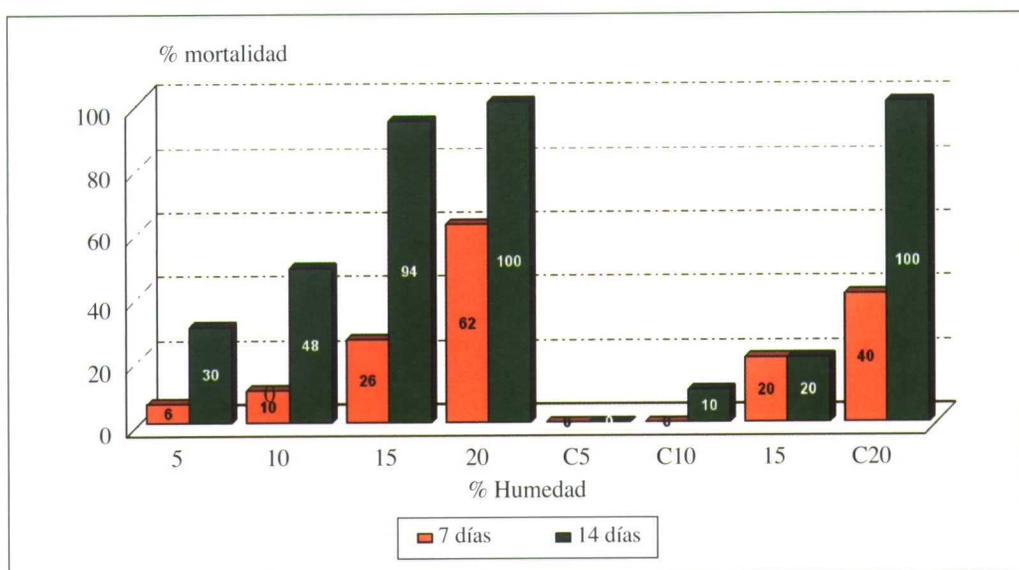


Figura 2. Porcentajes de mortalidad de larvas de *C. elephas* bajo diferentes porcentajes de humedad a los 14 días de aplicar 5.000 IJ de *Heterorhabditis bacteriophora* (C5, C10, C15 y C20 = controles de los diferentes porcentajes de humedad)

comercializadas por Biobest S.L. reducen significativamente las densidades de las larvas de cuarto estadio de *Curculio elephas*. *Heterorhabditis megidis* es la especie que presenta los porcentajes más bajos tanto en mortalidad como en eficacia, estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores en ensayos con curculiónidos, donde estos nematodos presentan mayor atracción por otras familias de insectos, principalmente lepidópteros (SAUNDERS y WEBSTER, 2000; BOFF *et al.*, 2001; MCGRAW y KOPENHÖFER, 2008). Las tres especies restantes presentaron resultados muy similares, siendo *Steinernema feltiae* la que muestra mejores resultados a diferentes dosis. Estos resultados difieren de los obtenidos por KEPENEKCI *et al.* (2004), ya que esta especie sólo causó un 40,2% de mortalidad sobre larvas de *C. elephas*. La capacidad infectiva o patogenicidad de los nematodos entomopatógenos está condicionada principalmente por la capacidad de sus juveniles infectivos en detectar la presencia del insecto, movilizarse por el sustrato hasta alcanzarlo y penetrar en su interior. Diferencias en uno de esos aspectos, indicarían capacidades infectivas diferentes (DOUCET y GIAYETTO, 1994), además, las variaciones de las condiciones experimentales (KAYA, 1990; GEORGIS y GAUGLER, 1991) dan diferencias en los resultados. De hecho, NYCZEPIR *et al.* (1992) citan como causa principal de la baja mortalidad que observaron en sus ensayos en comparación con otros similares, la baja humedad del suelo. En estos ensayos, la diferencia observada se debe a la susceptibilidad que presentan los nematodos entomopatógenos a diferentes factores abióticos, como son la temperatura y textura y composición del sustrato (SMITS, 1996; MENTI *et al.*, 2000), variando sustancialmente este último en los ensayos comparados. Por otro lado, se ha demostrado que existen variaciones en la virulencia intrínseca de las especies o cepas de nematodos (SHAPIRO-ILAN y COTTRELL, 2006), por lo que la cepa comercializada parece ser mejor que la utilizada por KEPENEKCI *et al.* (2004), obtenida por

ellos de diferentes suelos forestales. No sólo se puede deber a la diferencia en el sustrato utilizado, sino que la patogenicidad de una cepa de nematodo puede variar debido a la existencia de diferentes niveles de susceptibilidad o resistencia en las distintas poblaciones de las que se obtienen las larvas sobre las que se realizan los ensayos (SIKORA, 1990, en QUINTERO, 2003).

Por todo esto, se considera adecuado el uso de *H. bacteriophora*, *S. carpocapsa* y *S. feltiae* para la realización de tratamientos de control dirigidos a larvas de *C. elephas*. *H. megidis* es una especie que no se encuentra de forma natural en los suelos de la Península Ibérica (www.faunaeuropaea.org), y además presenta los valores más bajos de mortalidad y eficacia por lo que su utilización se puede desestimar. *S. feltiae* no sólo presenta buenos resultados, sino que también actúa con mayor rapidez sobre las larvas que las otras especies utilizadas (Figura 1). Debido a esto, cuando se realicen tratamientos en campo, donde las condiciones ambientales pueden cambiar desde el momento de la aplicación hasta que el nematodo encuentra a su hospedador, es importante utilizar un producto de rápida actuación que no se vea muy afectado por esos posibles cambios, sobre todo de temperatura y humedad.

La dificultad de los tratamientos en campo radica, entre otras, en hacer la aplicación en el momento idóneo para que los nematodos puedan desarrollarse y buscar sus presas. Como se ha visto en el ensayo de suelo, el grado de humedad más idóneo es de un 15% en suelo. En cuanto a la temperatura debe estar entre los 12 y 30 °C, ya que fuera de este rango puede reducirse la actividad de los productos. Si se tiene en cuenta que las larvas de *C. elephas* están enterradas, aproximadamente, desde noviembre hasta septiembre/octubre del siguiente año, se puede optar por una fecha entre esos meses donde las condiciones climáticas de la dehesa sean similares a las óptimas para el desarrollo de los nematodos. Observando las temperaturas medias y precipitaciones que se han recopi-

lado durante los últimos años (1998-2007) en Andalucía (Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía), los meses óptimos para realizar las aplicaciones son abril y mayo, ya que las temperaturas medias están dentro de los límites marcados anteriormente (13,13 °C y 16,67 °C) y los valores máximos superan pocos días los 30 °C. Si observamos las precipitaciones de estos meses no son las más abundantes del año, pero sí suficientes como para encontrar unos días tras alguna precipitación que permita la actividad de los nematodos en el suelo. Por otro lado, teniendo en cuenta los valores medios de temperatura y precipitaciones, septiembre y octubre serían meses adecuados para la aplicación de estos productos, sin embargo, en este periodo la mayoría de las larvas de *C. elephas* aún se encuentran dentro de los frutos (JIMÉNEZ *et al.*, 2005), lugar donde no son accesibles para los nematodos.

En los ensayos con varias dosis se ha observado que no existe una relación positiva

entre la concentración de juveniles infectivos de nematodos y la mortalidad de larvas de *C. elephas*. Para algunos agentes patógenos, es posible que una vez que se alcanza la dosis umbral de mortalidad, el aumento del número de patógenos no produzca más mortalidad (TANADA y FUXA, 1987). SMITH *et al.* (1993) y SHAPIRO-ILAN (2001), tampoco detectaron una relación dosis-respuesta cuando ensayaron con *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* y *S. feltiae* sobre *Curculio caryae*. Este hecho indica que para controlar las poblaciones de *C. elephas* se pueden aplicar dosis más bajas que las recomendadas por la casa comercial para otras especies plaga (www.biobest.com) y, por lo tanto, disminuir de manera sustancial el coste de los tratamientos. Este factor es muy importante dentro del manejo de las dehesas ya que, por definición constituye un sistema de explotación agroforestal sostenible construido sobre la base de recursos muy pobres (Ley 7/2010 para La Dehesa).

ABSTRACT

JIMÉNEZ, A. C., A. ANTONIETTY, A. GALLARDO, F. J. SORIA, M. VILLAGRÁN, M. E. OCETE. 2011. Effectiveness of several species of entomopathogenic nematodes to *Curculio elephas* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **37**: 9-17.

Curculio elephas Gyllenhal (1836) is an important pest of fagaceous trees fruits, being especially harmful to chestnut and oaks. Larval activity of this carpophagous insect on holm oak (*Quercus ilex ballota* (Desfontaines) Sampaio) causes a premature falling of acorns and weight and size reduction. This results in production loss and therefore involves a negative repercussion on livestock feeding. This species also decreases acorns germination capacity due to embryo destruction during larval development which negatively affects the natural regeneration of dehesas.

In this study, several commercial entomopathogenic strains have been tested (*Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, *H. megidis* Poinar, *Steinernema feltiae* (Filipjser) y *S. carpocapsae* (Weiser)) on last instars larvae in order to assess their susceptibility to each nematode species.

In assays, highest mortality appears using *H. bacteriophora* (92%), whereas the lower value has been obtained using *H. megidis* (48%). The highest effectiveness percentage (87.5%) has been observed using *H. bacteriophora*, at a dose of 4000 IJ per petri dish. In *S. feltiae* assays, at a dose of 1000 IJ per petri dish, it has been obtained a similar result (86.66%). In the assays carried out on earth, no significant differences have been detected between different doses of *H. bacteriophora* after two weeks of application. Optimum humidity value was 15% (w/w).

Data obtained indicate that *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae* y *S. feltiae* could be used in IPM programmes for *C. elephas* – especially *S. feltiae* – during prepupal diapause of *C. elephas*.

Key words: *Quercus ilex*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis*, *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*.

REFERENCIAS

- BOFF, M. I. C., WIEGERS, G. L., SMITS, P. H. 2001. Host influences on the pathogenicity of *Heterorhabditis megidis*. *Biocontrol*, **46**: 91-103.
- BRANCO, M., BRANCO, C., MEROUANI, H., ALMEIDA, M. H. 2002. Germination success, survival and seedling vigour of *Quercus suber* acorns in relation to insect damage. *Forest Ecology and Management*, **166** (1): 159-164.
- CHAKALI, G., ATTAL-BEDREDDINE, A., OUZANI, H. 2002. Insect pests of the oaks *Quercus suber* and *Q. Ilex* in Algeria. *Integrated Protection in Oak Forests*, **25**: 93-100.
- DOLINSKI, C., DEL VALLE, E., STUART, R. J. 2006. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, **38**: 422-427.
- DOUCET, M. A., GIAYETTO, A., 1994. Gama de huéspedes y especificidad en *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologia Mediterranea*, **22**: 171-178.
- FORST, S., CLARKE, D. 2002. Bacteria-nematode symbiosis. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematol.* CABI Publishing, New York, NY: 57-77.
- GARCÍA, F., 2005. Los nematodos entomopatógenos agentes de control de plagas. El control biológico de plagas y enfermedades. Ed. Publicacions de la Universitat Jaime I: 87-112.
- GEORGIS, R., GAUGLER, R. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal Economic Entomology*, **84**: 713-720.
- JIMÉNEZ, A., SORIA, F. J., VILLAGRÁN, M., OCETE, M. E. 2005a. Descripción del ciclo biológico de *Curculio elephas* Gyllenhal (1836) (Coleoptera: Curculionidae) en un encinar del sur de España. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 353-363.
- KAKOULI-DUARTE, T., LABUSCHAGNE, L., HAGUE, N. G. M. 1997. Biological control of black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) with entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida). *Annals of Applied Biology* **131**: 11-27.
- KAYA, H. K. 1990. Soil ecology. En *Entomogenous Nematodes in Biological control* (R. Gaugler and H.K. Kaya, Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL.: 93-115.
- KPENEKCI, I., GOKCE, A., GAUGLER, R. 2004. Virulence of three species of entomopathogenic nematodes to the chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematropica*, **34** (2): 199-204.
- LEIVA, M. J., FERNÁNDEZ-ALÉS, R. 2005. Holm-oak (*Quercus ilex* Subs. *ballota*) acorns infestation by insects in Mediterranean dehesas and shrublands. Its effect on acorn germination and seedling emergence. *Forest Ecology and Management*, **212**: 221-229.
- LEY 7/2010 PARA LA DEHESA. BOJA nº 144, de 23 de julio de 2010.
- MCGRAW, B. A., KOPPENHÖFER, A. M. 2008. Evaluation of two endemic and five commercial entomopathogenic nematode species (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) against annual bluegrass weevil (Coleoptera: Curculionidae) larvae and adults. *Biological Control*, **46**: 467-475.
- MENTI, H., WRIGHT, D. J., PERRY, R. N. 2000. Infectivity of populations of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* in relation to temperature, age and lipid content. *Nematology*, **2**: 515-521.
- MENU, F., DEBOUZIE, D. 1993. Coin-flipping plasticity and prolonged diapause in insects: example of the chestnut weevil *Curculio elephas* (Col., Curculionidae). *Oecologia*, **93**: 367-373.
- MENU, F., DESOUHANT, E. 2002. Bet-hedging for variability in life cycle duration: bigger and later emerging chestnut weevils have increased probability of a prolonged diapause. *Oecologia*, **132**: 167-174.
- MORTON, A., GARCÍA DEL PINO, F. 2005. Susceptibilidad de *Otiorynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) a nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernema y Heterorhabditidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 243-251.
- NYCZEPIR, A. P., PAYNE J. A. 1992. *Heterorhabditis bacteriophora*: A New Parasite of Pecan Weevil, *Curculio caryae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **60**: 104-106.
- PAPARATTI, B., SPERANZA, S. 1999. Biological control of chestnut weevil (*Curculio elephas* Gyll., Coleoptera, Curculionidae) with the entomopathogen fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. (Deuteromycotina, Hyphomycetes). Proc. 2nd Int. Symp. on Chestnut. *Acta Hortícola* **494**. Ed. G. Salesses.
- PICOAGA, A., ABELLEIRA, A., MANSILLA, J. P., PÉREZ, R., SALINERO, C. 2008. Primeros resultados en el control de larvas de curculiónidos a plantas de vivero con nematodos entomopatógenos. IV Jornadas Ibéricas de Horticultura Ornamental. 14-18 de octubre de 2008. Pontevedra, España.
- POMORSKI R.J., TARNAWSKI C. 1980. A new station of *Curculio elephas* Gyllenhal, 1836 (Col., Curculionidae) in Poland. *Przegląd Zoologiczny*, **23**: 213-214.
- QUINTERO, M. P. 2003. Comparación en laboratorio de la patogenicidad de tres especies nativas de nematodos entomopatógenos (Rhabditida) sobre larvas de tercer instar de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae). Trabajo de grado, Facultad de Ciencias. Universidad del Valle. Santiago de Cali. 49 pp.
- REYES, M. A. 2003. Patogenicidad de nematodos entomopatógenos (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) en larvas y pupas de la mosca de la fruta *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). Tesis doctoral. Maestría en Ciencias, Área Biotecnología. Univ. Colomina. Méjico.
- SAUNDERS, J. E., WEBSTER, J. M. 2000. Laboratory Test of the Susceptibility of some Forest Insect Pests to *Heterorhabditis megidis* H90 (Nematoda). *Journal of Invertebrate Pathology*, **76**: 76-78.
- SHAPIRO-ILAN, D. I. 2001. Virulence of Entomopathogenic Nematodes to Pecan Weevil Larvae, *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae), in the Laboratory. *Journal of Economic Entomology*, **94** (1): 7-13.
- SHAPIRO-ILAN, D. I., COTTRELL, T. E. 2006. Susceptibility of the Lesser Peachtree Borer (Lepidoptera:

- Sesiidae) to Entomopathogenic Nematodes under Laboratory Conditions. *Environmental Entomology*, **35** (2): 358-365.
- SMITS, P. H. 1996. Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science Technology*, **6**: 379-387.
- SMITH, M. T., GEORGIA, R., NYCZZEPIR, A. P., MILLER, R. W. 1993. Biological control of pecan weevil, *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae), with entomopathogenic nematodes. *Journal Nematology*, **25**: 78-82.
- SORIA, F. J., CANO, E., OCETE, M. E. 1996. Efectos del ataque de fitófagos perforadores en el fruto de la encina (*Quercus rotundifolia* Lam.). *Bol. San. Veg. Plagas*, **22**: 427-432.
- SORIA, F. J., VILLAGRÁN, M., MARTÍN, P., OCETE, M. E. 1999 a. *Curculio elephas* (Gyllenhal) (Col.: Curculionidae) y *Cydia fagiglandana* (Zeller) (Lep.: Tortricidae) en encina (*Quercus rotundifolia* Lam.): infestación y relaciones interespecíficas. *Bol. San. Veg. Plagas*, **25**: 125-130.
- SORIA, F. J., CANO, E., OCETE, M. E. 1999 b. Valoración del ataque de *Curculio elephas* (Gyllenhal) (Coleoptera, Curculionidae) y *Cydia* spp. (Lepidoptera, Tortricidae) en el fruto de alcornoque (*Quercus suber* Liné). *Bol. San. Veg. Plagas*, **25**: 69-74.
- SORIA, F. J., JIMÉNEZ, A., VILLEGRA, M., OCETE, M. E. 2005. Relación entre la colonización de la encina por *Curculio elephas* Gyllenhal (1836) (Coleoptera: Curculionidae) y el período de caída natural de frutos. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 365-375.
- TANADA, K., FUXA J. R. 1987. The pathogen population. En Fuxa and Tanada (eds.), *Epizootiology of insect diseases*. Wiley, New York: 113-157.
- VÁZQUEZ, F. M., ESPARRAGO F., LÓPEZ J. A., JARAQUEMADA, F. 1990. Los ataques de *Curculio elephas* Gyll. (*Balaninus elephas*) y *Carpocapsa* sp. L. sobre *Quercus rotundifolia* Lam. en Extremadura. *Bol. San. Veg. Plagas*, **16**: 755-759.
- WILSON, M., NITZSCHE, P., SCHEARER, P. W. 1999. Entomopathogenic nematodes to control black vine weevil (Coleoptera: Curculionidae) on strawberry. *Journal of Economic Entomology*, **92**: 651-657.

(Recepción: 19 julio 2010)

(Aceptación: 1 marzo 2011)